Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) an HeLa-Zellen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans Erich Rocker

aus Duisburg-Hamborn

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) an HeLa-Zellen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans Erich Rocker

aus Duisburg-Hamborn

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 9.7.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert

Referent: Doz. Dr. med. D. Müller

Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung 1

II. Material und Methodik 4

III. Ergebnisse

1. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Konzentration 8
2. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit 12
3. Untersuchungen zu einer möglichen Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidin 18

IV. Diskussion

1. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Konzentration 2o
2. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit 23
3. Untersuchungen zu einer möglichen Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidin 24

V. Zusammenfassung 25

VI. Literaturverzeichnis 26

I. Einleitung.

Am Aufbau der Desoxyribonukleinsäure (DNS) sind im wesentlichen vier Desoxyribonukleotide beteiligt, deren basische Komponenten Derivate des Pyrimidins und des Purins sind. Die wichtigsten Pyrimidinbasen der DNS sind das Cytosin und das Thymin. Die Desoxyribonukleoside dieser beiden Basen werden als Desoxycytidin (CdR) und Thymidin (TdR) bezeichnet. Von diesen beiden Nukleosiden, insbesondere aber von dem CdR soll im folgenden die Rede sein.

AMANO, MESSIER und LEBLOND (1959) wiesen in Verbindung mit der autoradiographischen Technik nach, daß das mit Tritium markierte fertige Pyrimidinnukleosid TdR ausschließlich in die DNS eingebaut wird. Sie konnten aus den histologischen Schnitten verschiedener Gewebe der Maus nach ^{3}H-TdR-Verabreichung die ^{3}H-Aktivität durch eine DNase-Behandlung vollständig beseitigen. Ebenso ließen sich aus HeLa-Zellen nach Inkubation in ^{3}H-TdR-haltigem Medium durch DNase-Behandlung 98 % der autoradiographisch nachweisbaren, in die Zellen eingebauten ^{3}H-Aktivität entfernen (MÜLLER, 1966 b).

TdR wird sowohl von tierischen als auch von pflanzlichen Organismen für die DNS-Synthese direkt verwertet (FRIEDKIN und WOOD, 1956; TAYLOR, 196o a, b; RACHMELER, GERHART und ROSNER, 1961). Die prozentuale Beteiligung des verabreichten TdR an der DNS-Synthese hängt dabei von der verabreichten Menge ab (STEWART et al., 1965; LANG, PILGRIM und MAURER, 1966; LANG, MÜLLER und MAURER, 1967). So ergaben Untersuchungen an HeLa-Zellen bei einer Konzentration von o,oo49 µg TdR/ml Medium eine Beteiligung von 1 % an neugebildetem DNS-TdR, bei einer Konzentration von 2,o µg/ml etwa 25 % (LANG, MÜLLER und MAURER, 1967).

Das TdR wird jedoch nicht ausschließlich in die DNS inkorporiert, sondern zum Teil rasch abgebaut, wie in-vitro-Versuche an Leukozyten, Mäusethymozyten, Ascites-Zellen und HeLa-Zellen ergaben. Die Hauptabbauprodukte sind Thymin, Dihydrothymin und ß-Ureido-isobuttersäure (JAQUEZ, 1962; ZAJICEK et al., 1963; COOPER und MILTON, 1964; MARSH und PERRY, 1964 a, b; LANG, MÜLLER und MAURER, 1966).

Der Tatsache, daß das TdR ausschließlich für die DNS-Synthese utilisiert wird, verdankt es seine vielfältige Verwendung zur Untersuchung des DNS-Stoffwechsels sowie insbesondere des Generationszyklus und seiner Teilphasen bei den verschiedensten Zellarten (siehe u.a. QUASTLER und SHERMAN, 1959; PILGRIM und MAURER, 1962).

Dem CdR wurde im Gegensatz zum TdR bisher viel weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Über den Abbau des CdR sowie insbesondere über seine Utilisation für die DNS liegen eine Reihe biochemischer Untersuchungen vor. Autoradiographische Untersuchungen mit markiertem CdR sind jedoch nicht bekannt.

Die ersten biochemischen Versuche mit radioaktiv markiertem CdR wurden von REICHARD und ESTBORN (1951) an Ratten durchgeführt. Sie verwandten ^{15}N-CdR, das sie biosynthetisch mit Hilfe von Escherichia coli herstellten. Sie fanden, daß das für die DNS utilisierte CdR nicht ausschließlich als DNS-Cytosin in der DNS erscheint, sondern daß beträchtliche Anteile auch als DNS-Thymin verwertet werden.

SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) untersuchten den Abbau des CdR. Sie inkubierten Hepatoma-Zellen in 2-^{14}C-CdR-haltiger Ascitesflüssigkeit und isolierten die Abbauprodukte, die im Verlauf von 6o Minuten nach dem Beginn der Inkubation auftraten. Dabei stellte sich heraus, daß sehr rasch Uridindesoxyribose (UdR) und in geringerer Menge Uracil entstand. Außerdem konnten TdR und Thymin nachgewiesen werden. Nach diesen Untersuchungen und auch parallelen Versuchen mit Homogenaten von Hepatoma-Zellen kamen sie zu dem Schluß, daß verabreichtes CdR zunächst zu Desoxycytidin-Monophosphat (dCMP) und durch eine nachgewiesene Desoxycytidylat-Desaminase in Desoxyuridin-Monophosphat (dUMP) umgewandelt wird. Das dUMP wird sodann weiter zu Desoxyuridin (UdR) und Uracil abgebaut. Thymidin-Monophosphat (TMP) entsteht dabei aus dem dUMP.

Der Reaktionsweg ist demnach folgendermaßen zu skizzieren:

$$\text{CdR} \rightarrow \text{dCMP} \rightarrow \text{dUMP} \rightleftarrows \begin{matrix}\text{UdR + Uracil} \\ \searrow\ \text{TMP}\end{matrix}$$

HeLa-Zellen vermögen ebenfalls verabreichtes CdR sehr rasch zu UdR abzubauen; jedoch wird dieses offenbar weiter zu Uracil metabolisiert, das nach längerer Versuchszeit in großer Menge vorliegt. Das ergaben Untersuchungen von MÜLLER und RATHENBERG (1967) mit ^{3}H-CdR-(G).

MALEY und MALEY (1963) untersuchten das Inkorporationsverhältnis DNS-TdR : DNS-CdR nach Inkubation mit 2-^{14}C-CdR an Hühner-Embryonalgewebe. Sie fanden, daß CdR in zweimal stärkerem Maße für die Thymidylsäure als für die Desoxycytidylsäure der DNS verwertet wird. In früheren Untersuchungen (1961) hatten sie festgestellt, daß einige Tumoren, u.a. das "NOVIKOFF-Hepatom", auch eine CdR-Desaminase enthalten. Die Zellen

sind in der Lage, verabreichtes CdR direkt zu UdR zu desaminieren. MALEY und MALEY (1963) halten demnach bei der Utilisation des CdR für die Thymidylsäure der DNS den folgenden Reaktionsweg für wahrscheinlicher:

CdR → UdR → dUMP → TMP

REICHARD und ESTBORN (1951) hatten gezeigt, daß das CdR für die DNS verwertet wird. SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) sprachen daraufhin davon, "that this nucleoside is a specific precursor of the pyrimidine bases of deoxyribonucleic acid ...". Die Bezeichnung "spezifischer Vorläufer" dürfte jedoch nur dann angebracht sein, wenn im vorliegenden Falle das CdR ausschließlich für die DNS und nicht auch für die RNS utilisiert wird. Zu diesem Zeitpunkt lagen jedoch keinerlei Untersuchungen darüber vor, ob das CdR auch für die RNS verwertet werden kann.

MÜLLER (1966 b) konnte durch vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-CdR und ^{3}H-TdR nachweisen, daß das CdR nicht ausschließlich für die DNS sondern auch -in geringerer Menge- für die RNS utilisiert wird.

Ziel der nachfolgenden autoradiographischen Untersuchungen war es nun, die Kinetik der CdR-Inkorporation kennenzulernen. Der Einbau des mit Tritium markierten Vorläufers sollte im Hinblick auf eine mögliche Hemmung der DNS-Synthese durch das CdR untersucht werden. Weiterhin war von Interesse die Inkorporation des CdR in Abhängigkeit von der Konzentration um festzustellen, ob eine Beziehung zwischen der verabreichten Menge und der Inkorporation -wie beim TdR- besteht. Schließlich sollte beobachtet werden, ob CdR ebenso wie das TdR in einem Pool aufgenommen und dort für die nachfolgende DNS-Synthese verwertet werden kann.

II. Material und Methodik.

1. Zellzüchtung.

Die Untersuchungen erfolgten an HeLa-Zellen (Laborstamm MH 5). Diese wurden in ROUX-Flaschen gezüchtet und regelmäßig in einem 3-4-Tage-Zyklus neu ausgesät. Die Ablösung des Zellrasens vom Boden der ROUX-Flaschen geschah bei 37°C im Brutschrank durch Anwendung einer o,o5%igen Trypsinlösung (Herstellung: 1o ml GKN = standardisierte Mg^{++}- und Ca^{++}-freie Salzlösung, o,15 ml Natriumbicarbonat und o,1 ml einer 1o%igen gepufferten Stammlösung von "Trypsin 1:25o", DIFCO, Detroit, Michigan). Nach etwa 25-minütiger Einwirkung des Trypsins wurde die gewonnene Zellsuspension zur Beseitigung des Trypsins mit GKN auf das 5-fache Volumen aufgefüllt und zentrifugiert (12 Min., ca. 9oo U/Min. bei +4°C). Das Sediment wurde in Anzüchtungsmedium suspendiert und die Zellzahl pro Volumeneinheit durch Zellzählung in einer NEUBAUER-Zählkammer ermittelt. Danach erfolgte die Einstellung der Zellsuspension auf eine bestimmte Zellzahl pro ml durch Zugabe des gleichen Mediums. Zur Weiterzüchtung wurden ROUX-Flaschen verwendet (5o.ooo oder 75.ooo Zellen/ml; 1oo ml/Gefäß). Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit sog. "Fütterungsmedium". Die Kulturen wurden bei 37 $\pm$ o,2°C gehalten.

Grundsätzlich wurden drei verschiedene Mediumzusammensetzungen verwendet, deren Grundlage EAGLES-Basal-Medium ist. Daneben enthielten die Medien Natriumbicarbonat, Penicillin und Streptomycin, Lactalbuminhydrolysat sowie Kälberserum. Das sog. "Versuchsmedium", dem der radioaktiv markierte Vorläufer zugesetzt wurde, enthielt kein Kälberserum und kein Lactalbuminhydrolysat. Das Fütterungs- und das Versuchsmedium wurden vor dem Zusatz des Kälberserums mit CO_2 begast. Die umseitige Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der verwendeten Kulturflüssigkeiten.

Lactalbuminhydrolysatlösung: 5%ige Lösung von Lactalbuminhydrolysat (DIFCO, Detroit, Michigan).

Natriumbicarbonatlösung: 1,4%ige Lösung mit Zusatz von Phenolrot, 4o mg ad 1oo ml.

Penicillin-Streptomycin-Lösung: 1,o4 x $1o^6$ E Penicillin und 1 g Streptomycin ad 1oo ml Wasser.

	Anzüchtungs-medium ml	Fütterungs-medium ml	Versuchs-medium ml
Eagles-Basal-Medium	9	9	1o
Lactalbuminhydrolysat-Lösung	1o	1o	-
Natriumbicarbonat-Lösung	4	12	12
Penicillin-Streptomycin-Lösung	1	1	1
Quarz-dest. Wasser	76	68	77
Kälberserum	1o	1o	-

2.) Herstellung von Deckglaskulturen.

Für die autoradiographischen Untersuchungen wurden Deckglaskulturen in sog. "LEIGHTON-Röhrchen" angelegt. Diese haben die Größe eines Reagenzglases und sind am unteren Ende mit einer flachen Wanne versehen. Hierin liegt ein 1o x 3o mm großes Deckglas, worauf die in das Röhrchen gebrachten Zellen der Suspension absinken und anwachsen.

Die LEIGHTON-Röhrchen wurden jeweils mit 1,5 ml einer Zellsuspension von 2 x $1o^5$ Zellen/ml beschickt, pro cm^2 Bodenfläche demnach $1o^5$ Zellen. Am folgenden Tag war das Deckglas mit einem dichten, jedoch noch nicht geschlossenen Zellrasen bedeckt. Etwa 2 Stunden vor der Verwendung der Deckglaskulturen für die Einbauversuche wurden sämtliche Röhrchen mikroskopisch auf einen intakten Zellrasen hin untersucht.

3. Durchführung der radioaktiven Versuche.

Das verwendete ^{3}H-CdR-(5-T) (RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham), spezifische Aktivität 83oo mC/mMol, wurde zunächst in Versuchsmedium auf eine Aktivität von 2o µC/ml verdünnt. Durch Zusatz von inaktivem CdR (SIGMA-Chemical-Company, St. Louis, Missouri) erfolgte dessen Einstellung auf eine spezifische Aktivität von 5ooo mC/mMol.

Aus einer Stammlösung von inaktivem CdR in Versuchsmedium (o,983 mg pro ml) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (Faktor 1o). Die Lösungen

dienten in allen nachfolgenden Versuchen zur Verdünnung des radioaktiv markierten CdR und somit zur Herstellung der jeweils erforderlichen spezifischen Aktivität.

Die Lösungen des ^{3}H-CdR und des inaktiven CdR wurden bei -25°C gehalten. Aus diesen Lösungen wurden für sämtliche Versuche die Medien mit der erforderlichen Aktivität pro ml, mit bestimmter CdR-Konzentration und somit bestimmter spezifischer Aktivität hergestellt. Verwendet wurden Aktivitäten von o,o92 bis 4,o µC/ml Versuchsmedium, CdR-Konzentrationen von o,oo42 bis 4,6 µg/ml und spezifische Aktivitäten von 5ooo bis 5 mC/mMol. Da diese Größen in den einzelnen Versuchen variieren, werden diese Werte jeweils bei den Ergebnissen mitgeteilt.

Zu Beginn eines Einbauversuches wurde die Zellkultur nach Abgießen des Mediums mit je 3 ml "HANKS Basal Salt Solution" (BSS) gewaschen und in jedes Röhrchen 1,o bzw. 2,o ml des ^{3}H-CdR-enthaltenden Mediums gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit, die zwischen 1o Minuten und 1o Stunden betrug, wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit BSS nachgespült. Anschließend erfolgte entweder sofort oder nach Verbleib der Zellen in Versuchsmedium ohne aktiven Vorläufer die Fixierung mit CARNOYscher Flüssigkeit (6 Teile Äthanol, 3 Teile Chloroform, 1 Teil Eisessig) für etwa 15 Minuten.

Während der Inkubation mit dem aktiven Vorläufer wurde streng auf eine rasche Durchführung der Medienwechsel geachtet. Spüllösungen und Medien hatten eine Temperatur von 37,5°C. Das Waschen und der Medienwechsel zu Beginn des aktiven Versuches dauerten maximal 1/2 Minute.

4. Herstellung der Autoradiogramme.

Nach der Fixierung und Trocknung wurden die Deckgläser mit Eukitt auf Objektträger aufgeklebt. Nach zweitägiger Trocknung erfolgte die Reinigung der Präparate von überschüssigem Eukitt mittels Xylol und weiter in einer absteigenden Alkoholreihe. Die so hergestellten Präparate können wie histologische Schnitte verwendet und weiterbehandelt werden. Zur Entfernung der löslichen, nicht in die DNS eingebauten Anteile des markierten Vorläufers wurden die Präparate wie folgt gewaschen: 1 Stunde in 5%iger Trichloressigsäure, 1/2 Stunde inFließwasser, anschließend 3 Stunden in einer o,5%igen Lösung von inaktivem CdR, 1 Stunde in Fließwasser, dann Spülung in aqua dest. Als Vorbereitung für das Auflegen des Filmes wurden die Präparate in Chromalaungelatine (37°C) getaucht, um den Film in erster Linie vor chemischen Einflüssen des Präparates zu schützen.

Die Autoradiogramme wurden hergestellt mit "stripping-film", AR 1o, KODAK, London. Der Film wurde in kaltem Wasser auf die Objektträger aufgelegt bei Verwendung eines KODAK Wratten Filters, Series I, und anschließend in völliger Dunkelheit 1 1/2 Stunden staubfrei getrocknet. Die Exposition erfolgte bei 4°C in trockener Luft. Die Expositionszeiten betrugen zwischen 2 und 34 Tagen. Die Autoradiogramme wurden 4 Minuten in einem Spezialentwickler bei einer Temperatur von 2o ∓ o,2°C entwickelt, kurz in 1%ige Essigsäure als Unterbrecherbad getaucht, nach 15-minütiger Fixierung 1/2 Stunde gewässert und abschließend mit aqua dest. abgespült. Danach erfolgte eine staubfreie Trocknung.

5. Ribonuklease-Behandlung.

Zur Entfernung der Ribonukleinsäure und somit der ^{3}H-RNS-Aktivität aus dem Karyoplasma und dem Cytoplasma der HeLa-Zellen wurde ein Teil der Präparate einer Behandlung mit Ribonuklease (RNase) unterworfen. Diese erfolgte nach der Waschung der Präparate in Trichloressigsäure und Lösung des inaktiven Vorläufers. Die Präparate wurden im Brutschrank bei 37°C für eine Dauer von 2o Stunden unter leichter Schaukelbewegung in einer RNase-Lösung gehalten (5 mg RNase A, SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg, ad 1oo ml NaCl-Phosphat-Puffer, pH 7,3). Anschließend wurden die Präparate nach einer kurzen Spülung für 2o Minuten in eine Lösung von Trichloressigsäure (5%ig) eingestellt, nochmals 5 Minuten gewässert und mit aqua dest. abgespült.

6. Färbung der Präparate.

Zur Darstellung der Zellen wurden diese durch den stripping-film hindurch gefärbt: 45 Minuten Hämatoxylin (nach BÖHMER), Abspülen mit aqua dest., 5 Sekunden Differenzieren in Salzsäure-Alkohol, 1/2 Stunde Fließwasser, 45 Sekunden Gegenfärbung mit 1%igem Eosin und Spülen mit aqua dest. Nach mindestens 5-stündiger Lufttrocknung wurden die Präparate mittels Glycerin-Gelatine mit einem Deckglas eingedeckt.

7. Auswertung der Autoradiogramme.

Bestimmt wurde die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) sowie der Prozentsatz der markierten Kerne (^{3}H-Index).

Für jeden Meßpunkt erfolgte eine Auswertung von 5 Präparaten. Zur

Bestimmung der SkZ/mK wurden pro Präparat mindestens 1ooo Silberkörner ausgezählt. Der ^{3}H-Index wurde ermittelt durch Auszählung von mindestens 35o Kernen pro Präparat. Hierfür wurde ein in 2o x 2o Felder eingeteiltes Planquadrat benutzt, das bei der verwendeten Optik (Ölimmersion 1oo x, Meßokular 1o x) eine Fläche von 8o x 8o/u begrenzt.

Der Nulleffekt war gering und wurde berücksichtigt. Er wurde über zellfreien Flächen ermittelt und auf die mittlere Kernfläche umgerechnet. Die Bestimmung der mittleren Kernfläche erfolgte nach der Methode von HAUG (1955) sowie durch planimetrische Messungen der mittels Zeichenokular abgezeichneten Kernflächen. Der Nulleffekt betrug im Mittel o,6 Silberkorn pro Kernfläche.

Die Expositionszeiten waren im allgemeinen so gewählt, daß die Zahl der Silberkörner über den Kernen in den Autoradiogrammen im Mittel 25 betrug.

Nach der Auswertung erfolgte eine Umrechnung der SkZ/mK auf eine Expositionszeit von einem Tag sowie auf eine Aktivität von o,1/uC/ml und eine spezifische Aktivität von 5ooo mC/mMol.

III. Ergebnisse.

1. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Konzentration.

Die nachfolgend dargelegten Untersuchungen hatten zum Ziel, die Inkorporation des ^{3}H-CdR-(5-T) in die DNS und in die RNS in Abhängigkeit von der Konzentration kennenzulernen.

HeLa-Zellen wurden für die Dauer von 6o Minuten in Medien inkubiert, die ^{3}H-CdR-(5-T) in den steigenden Konzentrationen o,oo42 , o,oo79 , o,o45 , o,46 und 4,6/ug/ml enthielten. Bei den Konzentrationen o,oo42 , o,oo79 und o,o45/ug/ml wurde eine spezifische Aktivität von 5ooo mC/mMol verwendet; bei den Konzentrationen o,46 und 4,6/ug/ml wurde die spezifische Aktivität durch Zugabe von inaktivem CdR reduziert. Die ^{3}H-Aktivitäten lagen dabei zwischen o,o92 und 4,o/uC/ml. Ein Teil der Präparate wurde vor der Herstellung der Autoradiogramme mit RNase behandelt. Es wurde die SkZ/mK sowie der ^{3}H-Index bestimmt und zwar an Präparaten ohne und nach RNase-Behandlung. Pro Meßpunkt wurden 5 Präparate ausgewertet.

Die Bestimmung des Prozentsatzes der markierten Kerne ergab, ins-

besondere bei der Verwendung höherer CdR-Konzentrationen, offensichtliche Unterschiede zwischen den Präparaten nach RNase-Behandlung einerseits und ohne RNase-Behandlung andererseits. Unabhängig von der Konzentration des CdR betrug der ^{3}H-Index nach RNase-Behandlung etwa 47 %. Andere Verhältnisse lagen dagegen bei den nicht mit RNase behandelten Präparaten vor. Hier betrug der ^{3}H-Index bei den Konzentrationen bis zu o,o45 /ug/ml etwa 54 %. Eine deutliche Zunahme des Prozentsatzes war bei o,46 /ug/ml mit etwa 63 % festzustellen. Bei der höchsten der angewandten Konzentrationen, 4,6 /ug/ml, betrug der ^{3}H-Index 95 %.

Während nach RNase-Behandlung Silberkörner ausschließlich über den Kernen zu finden waren, konnte man bei unbehandelten Präparaten, namentlich bei höheren Konzentrationen, auch über dem Cytoplasma Silberkörner finden; jedoch war deren Zahl im Vergleich zu jener über dem Kern nur gering und blieb unberücksichtigt.

Um die durch Silberkornauszählungen und Bestimmung des ^{3}H-Index ermittelten Werte an unbehandelten und an mit RNase behandelten Präparaten gegenüberstellen zu können, erfolgte die Berechnung der "Silberkornzahl/Kern" (SkZ/Kern). Hierunter ist die mittlere Silberkornzahl über sämtlichen (also markierten und nicht-markierten) Kernen zu verstehen. Sie ergibt sich aus der SkZ/mK und dem ^{3}H-Index.

Die Ergebnisse sind in der Abb.1 dargestellt. Die SkZ/Kern wurde hier auf die einheitliche Aktivität von o,1 /uC/ml für alle angewandten Konzentrationen umgerechnet. In der Abszisse sind die steigenden CdR-Konzentrationen logarithmisch aufgetragen und in der Ordinate -ebenfalls logarithmisch- die Silberkornzahl/Kern. Die durchgezogene Kurve stellt die Verhältnisse an nicht mit RNase behandelten Präparaten dar, die unterbrochene Kurve dagegen die Verhältnisse nach RNase-Behandlung. Aus dem Verlauf der Kurven geht hervor, daß keine lineare Beziehung zwischen der angebotenen und der inkorporierten Menge des Vorläufers besteht. Eine solche lineare Beziehung wäre gegeben, wenn bei steigenden CdR-Konzentrationen bei Verwendung einer gleichbleibenden Aktivität -also unter Bedingungen, wie sie hier nach Umrechnung dargestellt sind- die Silberkornzahl bei allen Konzentrationen unverändert bliebe. Eine solche Situation ist in der gestrichelten Linie in Höhe des ermittelten Wertes bei der niedrigsten CdR-Konzentration angedeutet.

Um die Abhängigkeit der Inkorporation von der Menge des verabreichten Vorläufers deutlich zu machen, erfolgte eine Umrechnung der in der Abb.1 dargestellten Werte auf eine einheitliche spezifische Aktivität

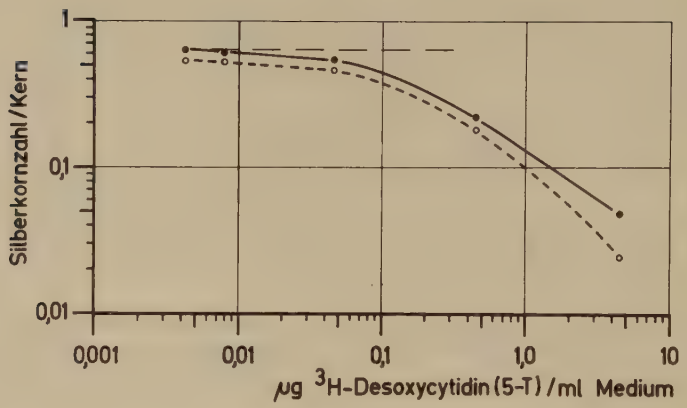

Abb.1: Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Konzentration.

CdR-Konzentrationen: o,oo42 , o,oo79 , o,o45 , o,46 und 4,6 µg/ml. Inkubationszeit: 1 Stunde. Abszisse: ^{3}H-CdR-(5-T)-Konzentration. Ordinate: SkZ/Kern (berechnet auf eine einheitliche Aktivität von o,1 µC/ml Medium).

Durchgezogene Kurve: SkZ/Kern bei Präparaten ohne RNase-Behandlung. Unterbrochene Kurve: SkZ/Kern bei RNase-behandelten Präparaten. Gestrichelte Linie: Angenommene lineare Beziehung zwischen angebotener und inkorporierter Menge des Vorläufers.

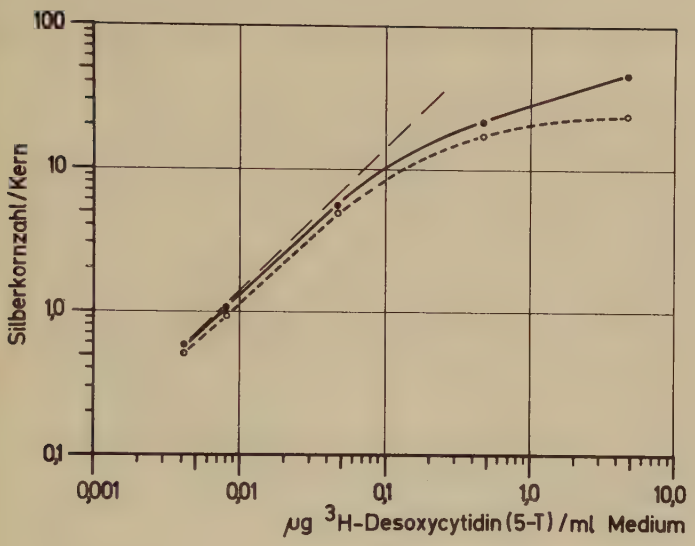

Abb.2: Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Konzentration.

CdR-Konzentrationen: 0,0042 , 0,0079 , 0,045 , 0,46 und 4,6 µg/ml.
Inkubationszeit: 1 Stunde. Abszisse: ^{3}H-CdR-(5-T)-Konzentration.
Ordinate: SkZ/Kern (berechnet auf eine einheitliche spezifische Aktivität von 5000 mC/mMol).
Durchgezogene Kurve: SkZ/Kern bei Präparaten ohne RNase-Behandlung.
Unterbrochene Kurve: SkZ/Kern bei RNase-behandelten Präparaten.
Gestrichelte Linie (90°): Angenommene lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Vorläufers und der SkZ/Kern.

von 5ooo mC/mMol (s.Abb.2). Die durchgezogene Kurve stellt die SkZ/Kern an unbehandelten, die unterbrochene Kurve die SkZ/Kern an RNase-behandelten Präparaten dar. Die gestrichelte Linie liegt in einem Winkel von 9o° und repräsentiert die lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der SkZ/Kern.

Nach Umrechnung auf eine einheitliche spezifische Aktivität repräsentiert eine gleiche Menge an inkorporierter ^{3}H-Aktivität auch eine gleiche Menge an inkorporiertem Vorläufer. Somit entsprechen in dieser Darstellung auch die "Silberkornzahlen pro Kern" den jeweiligen Mengen des inkorporierten Vorläufers pro Kern.

Der Verlauf der Kurven zeigt, daß eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Vorläufers im Medium und der SkZ/Kern nur angedeutet besteht im Bereich der Konzentrationen von o,oo45 bis o,o46 µg/ml. Ein fast paralleler Verlauf beider Kurven (ohne und nach RNase-Behandlung) ist gegeben bis etwa zu einer Konzentration von o,46 µg/ml. Bei höheren Konzentrationen weichen die Kurven stärker auseinander. Das bedeutet, daß bei höheren Konzentrationen größere Mengen von ^{3}H-Aktivität durch RNase-Behandlung aus den Kernen herauslösbar sind.

Die Differenz der SkZ/Kern zwischen den unbehandelten und den mit RNase behandelten Präparaten ist insbesondere bei den höheren Konzentrationen auf die Unterschiede im ^{3}H-Index zurückzuführen. Die SkZ/mK nämlich lag nach RNase-Behandlung nur geringfügig (etwa 2-5 %) unter der SkZ/mK unbehandelter Präparate.

2. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit.

Es wurde der Einbau des ^{3}H-CdR-(5-T) in die Kerne der HeLa-Zellen als Funktion der Inkubationszeit untersucht. Die Zellen erhielten ^{3}H-CdR mit einer Aktivität von o,1 µC/ml Medium (spezifische Aktivität 5ooo mC/mMol). Die CdR-Konzentration betrug demnach o,oo46 µg/ml Medium. Die Inkubationszeiten waren 1o, 2o, 3o, 6o und 9o Minuten, 2, 3, 5 und 8 Stunden. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen sofort fixiert und Autoradiogramme hergestellt. Es wurde die SkZ/mK sowie der ^{3}H-Index bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Abb.3 dargestellt. Die SkZ/mK zeigt bis zu 1 Stunde einen linearen Anstieg. Danach wird die Zunahme der SkZ/mK geringer, und nach einem Maximum zwischen 3 und 5 Stunden, fällt die

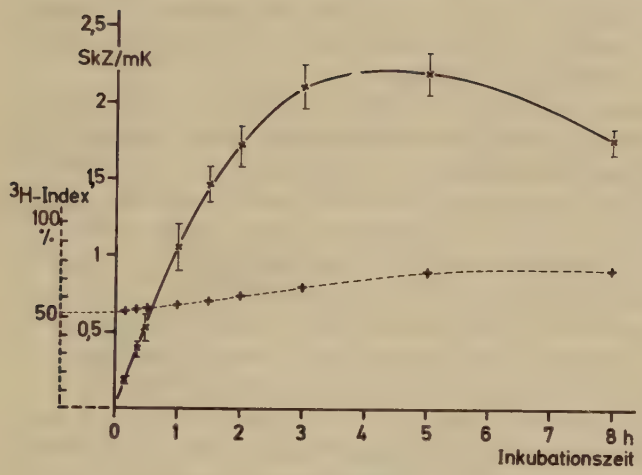

Abb.3: Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit.

1,o ml Medium/Leighton-Röhrchen. ^{3}H-CdR-Konzentration o,oo46 µg/ml; o,1 µC/ml (spezifische Aktivität 5ooo mC/mMol). Abszisse: Radioaktive Inkubationszeit. Ordinate: SkZ/mK. Unterbrochene Ordinate: ^{3}H-Index. Die SkZ/mK zeigt im Verlauf der 1. Stunde einen linearen Anstieg; danach erfolgt eine geringere Zunahme und zwischen 3 und 5 Stunden erreicht die Kurve ihr Maximum. Später nimmt die SkZ/mK wieder ab. Der ^{3}H-Index liegt 2o Minuten nach Versuchsbeginn bei 52 %. Bis zur 5. Stunde erfolgt ein kontinuierlicher, später ein etwas geringerer Anstieg. Bei 8 Stunden liegt der ^{3}H-Index bei 76 %.

Kurve wieder ab.

Der Prozentsatz markierter Kerne der Gesamtpopulation (^{3}H-Index) ist in der unterbrochenen Kurve dargestellt. Bei einer Inkubationszeit von 2o Minuten betrug er 52 %. Von diesem Zeitpunkt an bis zu 5 Stunden ist eine lineare Zunahme auf 75 %, danach bis zu 8 Stunden nach Inkubationsbeginn nur noch auf 76 % zu beobachten.

Bei fortgesetzter Inkubation ist also eine Minderung der Inkorporation des verabreichten Vorläufers festzustellen. Dieses Ergebnis läßt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: 1. Die Verminderung der Zunahme der SkZ/mK könnte auf eine Hemmung der DNS-Synthese durch Verabreichung von CdR zurückzuführen sein. 2. Sie könnte ebenso die Folge eines raschen Abbaues des Vorläufers sein. Um diese Möglichkeit zu prüfen wurde der Versuch in abgeänderter Form durchgeführt:

Es wurde ebenfalls die Inkorporation des ^{3}H-CdR als Funktion der Inkubationszeit -und zwar über eine Dauer von 1o Stunden- untersucht, jedoch erfolgte jeweils nach zwei Stunden (soweit die Kulturen über diese Zeit hinaus inkubiert wurden; also zur beginnenden 3., 5., 7. und 9. Stunde nach Inkubationsbeginn) die Erneuerung des Mediums aus dem gleichen Ansatz. Ebenso wie in dem vorangegangenen Versuch (Abb.3) wurde hier zunächst der zeitliche Verlauf der ^{3}H-CdR-Inkorporation bei der Konzentration von o,oo46 µg/ml Medium (spezifische Aktivität 5ooo mC pro mMol) untersucht, jedoch wurden hier jeweils 2,o ml Medium pro Leighton-Röhrchen verabreicht. Weiterhin wurde bei der gleichen Versuchsdurchführung die ^{3}H-CdR-Inkorporation bei den Konzentrationen o,o46 und o,46 µg/ml untersucht. Die verwendeten ^{3}H-Aktivitäten betrugen: bei o,oo46 µg/ml = o,1 µC/ml (spezifische Aktivität 5ooo mC/mMol); bei o,o46 µg/ml = o,2 µC/ml (spezifische Aktivität 1ooo mC/mMol); bei o,46 µg pro ml = o,5 µC/ml (spezifische Aktivität 25o mC/mMol).

Die SkZ/mK wurde bei den Konzentrationen o,o46 und o,46 µg/ml auf eine spezifische Aktivität von 5ooo mC/mMol umgerechnet.

Die Abb.4 zeigt die Ergebnisse, die bei einer Konzentration von o,oo46 µg/ml -hier also bei Verwendung von 2,o ml Medium pro Leighton-Röhrchen und 2-stündiger Erneuerung des Mediums- gewonnen wurden. Hier ist bis zur 7. Stunde ein linearer Anstieg der SkZ/mK festzustellen. Bei 1o Stunden ist eine geringe Verminderung der Zunahme der SkZ/mK zu beobachten.

Die Abb.5 zeigt die Werte, die bei gleicher Versuchsanordnung bei Verwendung von o,o46 µg/ml gewonnen wurden. Die SkZ/mK betrug nach 1 Stunde etwa 1o. In der nachfolgenden Zeit war bis zu 1o Stunden ein

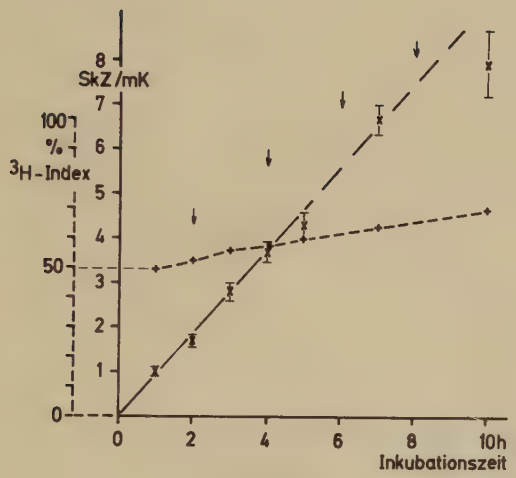

Abb.4: Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit.

2,o ml Medium/Leighton-Röhrchen. ^{3}H-CdR-Konzentration o,oo46 µg/ml; o,1 µC/ml (spezifische Aktivität 5ooo mC/mMol). Erneuerung des Mediums nach jeweils 2 Stunden (Pfeile). Abszisse: Radioaktive Inkubationszeit. Ordinate: SkZ/mK. Unterbrochene Ordinate: ^{3}H-Index.
Die SkZ/mK zeigt bis zur 7. Stunde einen linearen Anstieg, danach ist die Zunahme bis zur 1o. Stunde geringfügig vermindert. Der ^{3}H-Index steigt von Versuchsbeginn (nach 1 Stunde etwa 53 %) nahezu kontinuierlich bis zur 1o. Stunde (etwa 7o %) an.

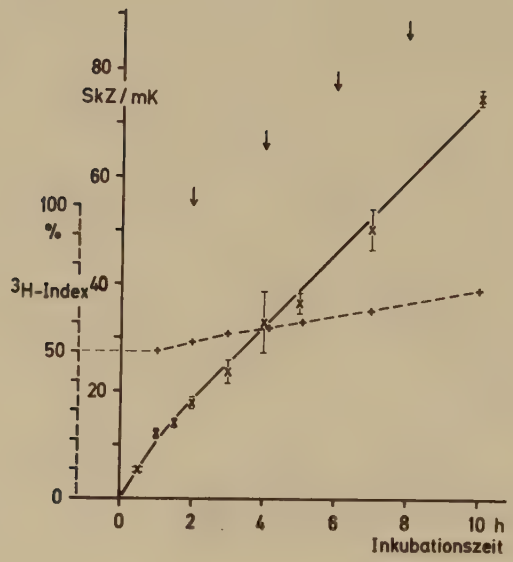

Abb.5: Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit.

2,o ml Medium/Leighton-Röhrchen. ^{3}H-CdR-Konzentration o,o46 ug/ml; o,2 uC/ml (spezifische Aktivität 1ooo mC/mMol). Erneuerung des Mediums nach jeweils 2 Stunden (Pfeile). Abszisse: Radioaktive Inkubationszeit. Ordinate: SkZ/mK. Unterbrochene Ordinate: ^{3}H-Index.
Die SkZ/mK steigt bis zum Versuchsende nahezu linear an. Der ^{3}H-Index läßt von Versuchsbeginn an (etwa 5o % bei 1 Stunde) bis zur 1o. Stunde (etwa 72 %) einen kontinuierlichen Anstieg erkennen.

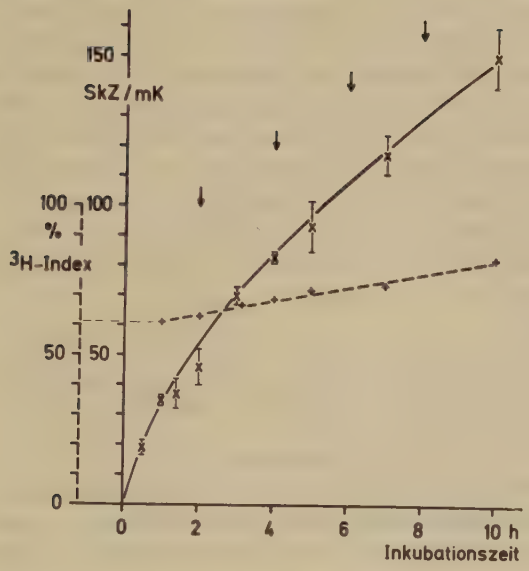

Abb.6: Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit.

2,o ml Medium/Leighton-Röhrchen. ^{3}H-CdR-Konzentration o,46 µg/ml; o,5 µC/ml (spezifische Aktivität 25o mC/mMol). Erneuerung des Mediums nach jeweils 2 Stunden (Pfeile). Abszisse: Radioaktive Inkubationszeit. Ordinate: SkZ/mK. Unterbrochene Ordinate: ^{3}H-Index.
Die SkZ/mK zeigt im Verlauf der 1. Stunde einen starken Anstieg, später ist die Zunahme geringer. Der ^{3}H-Index liegt nach 1 Stunde nach Versuchsbeginn bereits bei etwa 61 % und steigt im weiteren Verlauf bis auf etwa 83 % an.

kontinuierlicher Anstieg nachweisbar. Der Prozentsatz markierter Kerne lag zu diesem Zeitpunkt bei 72 %. Die SkZ/mK liegt hier also höher, wie es auch nach den Versuchen über die Inkorporation als Funktion der Konzentration zu erwarten war.

In der Abb.6 sind die Ergebnisse bei Verwendung der Konzentration von o,46 /ug/ml dargestellt. Die SkZ/mK beträgt nach einstündiger Inkubation 35, sie steigt hier jedoch nicht linear an. Nach 3 Stunden verringert sich die Zunahme der SkZ/mK. Das Verhalten des ^{3}H-Index unterscheidet sich hier von jenem in den vorausgegangenen Versuchen. Der Prozentsatz markierter Kerne betrug nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bereits 61 %; nach einem kontinuierlichen Anstieg wurde sodann nach 1o Stunden der Wert von 83 % ermittelt.

3. Untersuchungen zu einer möglichen Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidin.

Untersuchungen mit ^{3}H-TdR haben insbesondere bei der Anwendung einer sog. "Puls-Markierung" gezeigt, daß verschiedene Zellarten aufgenommenes ^{3}H-TdR zu speichern vermögen und daß sie diese gespeicherten und phosphorylierten Derivate des TdR auch nach Beendigung der Inkubation für die DNS-Synthese verwerten können (PAINTER und DREW, 1959; GALL und JOHNSON, 196o; CLEAVER und HOLFORD, 1965). Eine derartige Pool-Bildung von Derivaten des TdR konnte auch bei HeLa-Zellen nachgewiesen werden (MÜLLER, 1966 a). Diese Feststellungen gaben Veranlassung zu der Untersuchung, ob auch Derivate des CdR in einem Pool gespeichert werden können.

Am Tage nach der Aussaat wurden HeLa-Zellen für die Dauer von 3o Minuten in einem Medium inkubiert, das ^{3}H-CdR-(5-T) in einer Konzentration von o,46 /ug/ml enthielt (1,o /uC/ml; spezifische Aktivität 5oo mC pro mMol). Am Ende der Inkubationszeit wurde ein Teil der Zellen fixiert, andere erhielten nach dreimaliger vorsichtiger Spülung mit BSS neues Medium, das jedoch kein ^{3}H-CdR enthielt. Die Fixierung dieser Zellen erfolgte nach 1/2, 1, 2 bzw. 3 Stunden. Die Präparate wurden mit RNase behandelt und Autoradiogramme hergestellt. Es wurde die SkZ/mK bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Abb.7 dargestellt. Daraus geht hervor, daß innerhalb des genannten Versuchszeitraumes keine Veränderung der SkZ/mK zu beobachten ist.

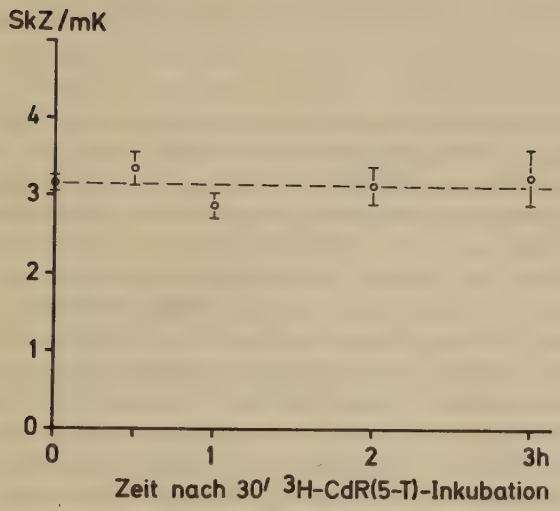

Abb.7: Untersuchungen zu einer möglichen Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidin.

1,o ml Medium/Leighton-Röhrchen. ^{3}H-CdR-(5-T)-Konzentration o,46 µg/ml; 1,o µC/ml (spezifische Aktivität 5oo mC/mMol). Inkubationszeit: 1/2 Stunde, anschließend Mediumwechsel und Fixierung nach o, 1/2, 1, 2 und 3 Stunden nach Beendigung der ^{3}H-CdR-(5-T)-Inkubation.
Abszisse: Zeit nach Beendigung der Inkubation mit dem aktiven Vorläufer.
Ordinate: SkZ/mK (nach RNase-Behandlung).
Die SkZ/mK liegt bis zu 3 Stunden nach Entfernen des aktiven Vorläufers im Bereich einer horizontalen Geraden.

IV. Diskussion.

1. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Konzentration.

Über die Abhängigkeit der Inkorporation von Pyrimidin-Desoxyribonukleosiden von der verabreichten Menge derselben liegen bisher nur wenige Berichte und zwar ausschließlich nach Untersuchungen mit ^{3}H-TdR vor (CLEAVER und HOLFORD, 1965; STEWART et al., 1965; LANG, PILGRIM und MAURER, 1966; LANG, MÜLLER und MAURER, 1967). CLEAVER und HOLFORD (1965) führten derartige Versuche an L-Zellen durch und fanden bei Konzentrationen bis zu $1o^{-6}$ M (= o,25 /ug/ml) eine lineare Beziehung zwischen der externen Konzentration und der Inkorporation. Danach soll die Einbaurate von ^{3}H-TdR proportional der Quadratwurzel der TdR-Konzentration im Medium sein. Bei Konzentrationen über o,25 /ug TdR/ml fanden sie auch bei zunehmendem TdR-Angebot keine Steigerung der Inkorporation mehr.

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse von STEWART et al. (1965) nach Untersuchungen an verschiedenen Zellarten der Maus. Danach besteht keine lineare Beziehung zwischen angebotener und inkorporierter Menge des ^{3}H-TdR. Zu gleichen Resultaten gelangten LANG, PILGRIM und MAURER (1966), die entsprechende Untersuchungen mit autoradiographischen und biochemischen Methoden an der Maus mit ^{14}C-TdR und ^{3}H-TdR durchführten. Ebenso zeigten LANG, MÜLLER und MAURER (1967) in Versuchen an HeLa-Zellen mit ^{3}H-TdR eine nicht-lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Vorläufers im Medium und seiner Inkorporation in die DNS.

Die eigenen Versuche zielten darauf ab festzustellen, ob die Inkorporation des CdR ebenfalls von der Konzentration des Vorläufers im Medium abhängig ist. Die Versuchsdurchführung mußte sich jedoch von jener, die bei Verwendung des ^{3}H-TdR benutzt wurde, unterscheiden. Denn Untersuchungen von MÜLLER (1966 b) hatten ergeben, daß CdR nicht ausschließlich für die DNS sondern ebenso für die RNS utilisiert wird. Daher erschien eine Behandlung der Präparate mit RNase erforderlich.

Die Bestimmung des Prozentsatzes markierter Kerne erbrachte Unterschiede zwischen den Präparaten ohne und nach RNase-Behandlung. Diese wurden umso deutlicher, je höher die verwendete CdR-Konzentration lag. Nach RNase-Behandlung wurde ein Prozentsatz markierter Kerne von etwa 47 % festgestellt. Dieser entspricht dem sog. ^{3}H-Index, d.h. dem

dem Prozentsatz der in der DNS-Synthese befindlichen Kerne. Das kann angenommen werden, da nach RNase-Behandlung ausschließlich die in die DNS eingebaute ^{3}H-Aktivität in den Kernen verbleiben wird. LANG, MÜLLER und MAURER (1967) fanden nach ^{3}H-TdR-Inkubation bei HeLa-Zellen unter entsprechenden Versuchsbedingungen einen gleichen ^{3}H-Index zwischen 46 und 48 %. Anders dagegen verhielt sich nach der ^{3}H-CdR-Inkubation der Prozentsatz markierter Kerne in den nicht mit RNase behandelten Präparaten. Hier zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit von der verwendeten Vorläufer-Konzentration. Während der Prozentsatz markierter Kerne bis zu einer Konzentration von o,o46 µg/ml etwa 54 % betrug, stieg dieser bei einer Konzentration von o,46 µg/ml auf 63 % an und betrug schließlich bei einer Konzentration von 4,6 µg/ml 95 %.

Die Silberkornzahl pro markiertem Kern (SkZ/mK) hätte unter diesen Bedingungen bei Gegenüberstellung der unbehandelten und der mit RNase behandelten Präparaten kein klares Bild der Inkorporationsverhältnisse ergeben. Daher wurde die mittlere Silberkornzahl über allen Kernen der Gesamtpopulation (SkZ/Kern) aus dem ^{3}H-Index und der SkZ/mK berechnet.

Betrachtet man anhand der SkZ/Kern die Inkorporationsverhältnisse, so zeigt sich, daß auch bei den niedrigen Konzentrationen ein geringer Teil der in den Kern eingebauten ^{3}H-Aktivität durch RNase-Behandlung herauslösbar ist. Dieser Anteil nimmt bei steigenden Konzentrationen zu. Bei Konzentrationen zwischen etwa o,oo46 und o,o46 µg/ml werden ungefähr 15 % der ^{3}H-Aktivität für die RNS-Synthese verwertet; bei der höchsten verwendeten Konzentration beträgt dieser Anteil dagegen nahezu 6o %.

Die Feststellung von MÜLLER (1966 b) wie auch diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Resultaten von REICHARD und ESTBORN (1951). Diese fanden nach biochemischen Untersuchungen an Rattengewebe, daß CdR nur für die DNS utilisiert wird, und meinten, eine Verwertung für die RNS sei wegen der Irreversibilität der Ribosereduktion nicht möglich. SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) stellten fest, daß Hepatoma-Zellen 2-^{14}C-CdR zu UdR und Uracil abzubauen vermögen. Inzwischen ergaben Untersuchungen mit ^{3}H-CdR-(G) an HeLa-Zellen, daß diese ebenfalls das CdR zu Uracil abbauen (CdR → UdR → Uracil) (MÜLLER und RATHENBERG, 1967). Danach ist anzunehmen, daß die Utilisation des CdR für die RNS sehr wahrscheinlich über das Abbauprodukt Uracil erfolgt. Eine Verwertung des Uracils für die RNS wurde durch LEIBMANN und HEIDELBERGER (1955) sowie von CANELLAKIS (1955) nachgewiesen.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit Resultaten an anderen biologischen Objekten ist bisher nicht möglich, da entsprechende Untersuchungen

aus der Literatur nicht bekannt sind. Biochemische Versuche mit ^{3}H-CdR-(5-T) sowie ^{3}H-CdR-(G) an Hefe-Zellen (Candida albicans) zeigten allerdings, daß 98 bzw. 95 % der ^{3}H-Aktivität in die DNS und nur ein Bruchteil in die RNS eingebaut wird (SANDER, 1968).

Betrachtet man nun allein die Ergebnisse, die aus den Präparaten nach RNase-Behandlung gewonnen wurden -also das Verhalten der SkZ/Kern, die auf den Einbau von ^{3}H-Aktivität in die DNS zurückzuführen ist-, so ergibt sich folgendes Bild: Im Bereich der untersuchten Konzentrationen besteht offensichtlich keine lineare Abhängigkeit zwischen der angebotenen ^{3}H-CdR-(5-T)-Konzentration im Medium und der Menge des in die DNS eingebauten Vorläufers. Die Zunahme der SkZ/Kern wird im Bereich höherer Konzentrationen geringer. Bei der Steigerung der Konzentration von o,oo42 auf o,o45 µg/ml Medium, also um den Faktor 1o,7, erhöhte sich die SkZ/Kern noch um den Faktor 9,5. Bei den weiteren Konzentrationssteigerungen (von o,o45 auf o,46 bzw. von o,46 auf 4,6 µg/ml) jeweils nur noch um den Faktor 3,8 bzw. 1,3.

HeLa-Zellen machen demnach zwar von einem erhöhten Angebot des CdR Gebrauch. Sie sind jedoch nicht in der Lage, einen jeweils gleich großen Prozentsatz des ihnen angebotenen markierten Vorläufers CdR im Bereich der Konzentrationen von o,oo42 bis 4,6 µg/ml für die DNS-Synthese zu verwerten. Es scheint sich die Einbaurate auch bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration einem konstanten Wert zu nähern. Auch wenn man von einer möglichen toxischen Einwirkung absieht, kann nicht mit einer nennenswerten Zunahme der SkZ/Kern, also der Inkorporation in die DNS, gerechnet werden.

Diese Feststellungen stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bei der Verwendung von ^{3}H-TdR an HeLa-Zellen gewonnen wurden (LANG, MÜLLER und MAURER, 1967); sie sind auch vergleichbar mit den Befunden an verschiedenen Zellarten der Maus nach Verabreichung von ^{3}H-TdR (STEWART et al., 1965; LANG, PILGRIM und MAURER, 1966; LANG, MÜLLER und MAURER, 1967).

Bei diesen Betrachtungen ist zu berücksichtigen, daß bei der Verwendung des ^{3}H-CdR-(5-T) lediglich die in die Desoxycytidylsäure der DNS eingebaute ^{3}H-Aktivität in Erscheinung tritt, die Thymidylsäure der DNS jedoch nicht markiert erscheint. Denn bei dem zur Thymidin-Monophosphat-Bildung führenden Methylierungsprozess geht das in Stellung 5 stehende Tritium-Atom verloren. Eine Utilisation des CdR für die Thymidylsäure der DNS kann jedoch als sicher angenommen werden (REICHARD und ESTBORN, 1951; SCHNEIDER und ROTHERHAM, 1961; MÜLLER, 1966 b).

2. Die Inkorporation von ^{3}H-Desoxycytidin-(5-T) als Funktion der Inkubationszeit.

Durch diese Untersuchungen sollte geklärt werden, wie sich die ^{3}H-CdR-Inkorporation bei einer länger dauernden Inkubation verhält. Die ersten Untersuchungen über einen Zeitraum von 8 Stunden zeigten bei der Verwendung von o,oo46 µg ^{3}H-CdR/ml keine lineare Beziehung zwischen der SkZ/mK -also der inkorporierten ^{3}H-Aktivität- und der Inkubationszeit. Nur bis etwa 9o Minuten nach Inkubationsbeginn war eine lineare Zunahme der ^{3}H-CdR-Inkorporation zu beobachten. In dem nachfolgenden Zeitraum war jedoch die Zunahme geringer und nach einem Maximum zwischen 3 und 5 Stunden fiel die Kurve wieder zu einem niedrigeren Wert ab.

Für diese Ergebnisse können zwei Erklärungen gegeben werden: 1. Die Ursache für diesen Inkorporationsstop könnte eine Hemmung der DNS-Synthese sein. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Inkubation mit ^{3}H-TdR gemacht (BIANCHI, CRATHORN und SHOOTER, 1962; RUBINI et al., 1962). 2. Ein rascher Abbau des Vorläufers könnte der Grund für das Nachlassen der Inkorporation sein. Dies stellte sich später auch als zutreffende Ursache für den Inkorporationsstop bei ^{3}H-TdR-Verabreichung heraus (COOPER und MILTON, 1964).

Um diese Frage zu klären, wurden Versuche in abgeänderter Form durchgeführt; es wurden höhere Konzentrationen verwendet und das Medium zweistündlich erneuert. Danach war über den gesamten Versuchszeitraum eine kontinuierliche Inkorporation zu beobachten. Gegen eine hemmende Wirkung des CdR auf die DNS-Synthese spricht besonders die fortdauernde Inkorporation bei der höchsten angewandten Konzentration von o,46 µg/ml. Die hierbei allerdings später beobachtete verringerte Zunahme der SkZ/mK läßt sich damit erklären, daß bei der Zellteilung ständig die in die RNS inkorporierte Aktivität -die bei dieser Konzentration besonders deutlich ist- auf die Tochterzellen aufgeteilt wird. Die erhebliche Utilisation des ^{3}H-CdR für die RNS findet besonders bei dieser Konzentration auch im Verhältnis des Prozentsatzes markierter Kerne ihren Ausdruck, der hier nach einstündiger Inkubation bereits 61 % beträgt und bei 1o Stunden einen Wert von 83 % erreicht.

Die Resultate lassen also eindeutig erkennen, daß die Abnahme der Inkorporationsrate bei fortdauernder Inkubation ohne Erneuerung des Mediums nicht auf einem Hemmeffekt beruht, sondern vielmehr die Folge eines raschen Abbaues des CdR sein dürfte. Diese Schlußfolgerung wird auch durch die Ergebnisse biochemischer Untersuchungen (MÜLLER und

RATHENBERG, 1967) bestätigt, nach denen ^{3}H-CdR-(G) sehr rasch zu Uridin-desoxyribose und Uracil sowie teilweise auch zu Cytosin abgebaut wird.

3. Untersuchungen zu einer möglichen Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidin.

Untersuchungen an verschiedenen Zellsystemen haben gezeigt, daß TdR in Form phosphorylierter Derivate in den Zellen gespeichert werden kann und diese Derivate nach Wegnahme des Vorläufers für die nachfolgende DNS-Synthese utilisiert werden können (PAINTER und DREW, 1959; GALL und JOHNSON, 1960; CLEAVER und HOLFORD, 1965). Auch für HeLa-Zellen konnte nachgewiesen werden, daß die in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Zellen TdR-Derivate in einem Pool zu speichern vermögen (MÜLLER, 1966 a). Nach einer einstündigen Inkubation von ^{3}H-TdR dauerte der Einbau ^{3}H-markierter TdR-Derivate weitere 3 Stunden an, und es wurde innerhalb dieses Zeitraumes nahezu eine Verdoppelung derjenigen SkZ/mK festgestellt, die nach Beendigung der "Puls-Markierung" vorlag.

Die Untersuchungen mit ^{3}H-CdR-(5-T) zeigen indessen keine entsprechenden Resultate; die SkZ/mK blieb im Verlaufe von 3 Stunden nach einer 30 Minuten dauernden "Puls-Markierung" unverändert. Danach ist anzunehmen, daß verabreichtes ^{3}H-CdR-(5-T) nicht in Form von Phosphat-Derivaten gespeichert und nachfolgend für die fortdauernde DNS-Synthese verwendet wird.

Diese Feststellung kann damit erklärt werden, daß das CdR einerseits in wesentlich geringerem Maße für die DNS-Synthese utilisiert wird als das TdR und andererseits der Abbau des ^{3}H-TdR (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966) wesentlich langsamer erfolgt als der Abbau des ^{3}H-CdR (MÜLLER und RATHENBERG, 1967).

Einschränkend ist jedoch darauf hinzuweisen, daß die hier besprochenen Untersuchungen ausschließlich mit ^{3}H-CdR-(5-T) durchgeführt wurden und daher nur eine Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidins verneint werden kann.

V. Zusammenfassung.

Es wurde der Einbau des ^{3}H-Desoxycytidin (^{3}H-CdR) in die Kerne von HeLa-Zellen autoradiographisch an Deckglaskulturen untersucht. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte durch Auszählung der mittleren Silberkornzahl über den markierten Kernen und des Prozentsatzes markierter Kerne (^{3}H-Index). Als Maß für die ^{3}H-CdR-Inkorporation wurde die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) bzw. die mittlere Silberkornzahl über den markierten und nicht-markierten Kernen (SkZ/Kern) verwertet. Zur getrennten Erfassung der in die DNS und in die RNS inkorporierten ^{3}H-Aktivität wurden in einigen Versuchen Autoradiogramme ohne und nach RNase-Behandlung hergestellt. Es wurde die Markierungsform ^{3}H-CdR-(5-T) verwendet, wobei nur die als Desoxycytidylsäure in die DNS inkorporierten Anteile markiert in Erscheinung treten. Als Thymidylsäure in die DNS eingebaute Anteile sind nach der vorangegangenen Methylierung am C-5 des Pyrimidinringes nicht mehr markiert.

Untersuchungen der ^{3}H-CdR-(5-T)-Inkorporation als Funktion der Konzentration (zwischen o,oo42 und 4,6 µg/ml) ergaben, daß die Zellen bei zunehmendem Angebot des Vorläufers einen immer kleiner werdenden Prozentsatz desselben verwerten. Es besteht also keine lineare Beziehung zwischen der Konzentration und der Inkorporation.

Bestätigt wurde die Verwertung des ^{3}H-CdR-(5-T) für die DNS und für die RNS, wobei beobachtet werden konnte, daß das Ausmaß der Utilisation für die RNS bei steigender Konzentration zunimmt.

Einbauversuche mit Inkubationszeiten bis zu 1o Stunden und mit verschiedenen ^{3}H-CdR-(5-T)-Konzentrationen ergaben, daß ^{3}H-CdR-(5-T) offenbar rasch abgebaut wird. Eine fortlaufende Erneuerung des Mediums hatte eine kontinuierliche Inkorporation in die HeLa-Zellkerne zur Folge. Eine Hemmung der Nukleinsäuresynthese durch das CdR konnte bis zu einer Konzentration von 4,6 µg/ml und über eine Versuchsdauer bis zu 1o Stunden nach Inkubationsbeginn nicht nachgewiesen werden.

Eine Pool-Bildung von Derivaten des Desoxycytidins fand nach Gabe von ^{3}H-CdR-(5-T) nicht statt.

VI. Literaturverzeichnis.

AMANO,M., B.MESSIER and C.P.LEBLOND: Specificity of labelled thymidine as a deoxyribonucleic acid precursor in radioautography. J. Histochem. Cytochem. 7, 153-155 (1959).

BIANCHI,P.A., A.R.CRATHORN and K.V.SHOOTER: The use of tritium-labelled thymidine in studies on the synthesis of deoxyribonucleic acids. In: Tritium in Physical and Biol. Sc., II. Int. At. En. Agency, Vienna (1962), 269-276.

CANELLAKIS,E.S.: Some aspects of the metabolism in-vitro of 2-^{14}C-Labelled orotic acid, uracil, uridine and uridylic acid. Fed. Proc. 14, 324 (1955).

CLEAVER,J.E. and R.M.HOLFORD: Investigations into the incorporation of ^{3}H-thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling. Biochim. Biophys. Acta 103, 654-671 (1965).

COOPER,E.H. and J.D.MILTON: The incorporation and degrägation of pyrimidine DNA precursors by human leucocytes. Brit. J. Cancer 18, 701-713 (1964).

FRIEDKIN,M. and H.WOOD: Utilization of thymidine-C^{14} by bone marrow cells and isolated thymus nuclei. J. Biol. Chem. 220, 639-651 (1956).

GALL,J.G. and W.W.JOHNSON: Is there "metabolic" DNA in the mouse seminal vesicle? J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 657-666 (1960).

HAUG,H.: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. Zschr. Anat. Entw.gesch. 118, 302-312 (1955).

JAQUEZ,J.A.: Transport and enzymic splitting of pyrimidine nucleosides in Ehrlich cells. Biochim. Biophys. Acta 61, 265-277 (1962).

LANG,W., D.MÜLLER and W.MAURER: Determination of thymidine metabolism in HeLa cell cultures by a combined electrophoretic and paper chromatographic method. Exptl. Cell Res. 44, 645-648 (1966).

- - : Percental participation of labelled thymidine in the synthesis of DNA-thymine in mouse tissues and HeLa cells. Exptl. Cell Res. (1967), im Druck.

LANG,W., CH.PILGRIM und W.MAURER: Prozentualer Anteil von ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin an der DNS-Synthese von Zellarten der Maus. Naturwissenschaften 53, 21o (1966).

LEIBMANN,K.C. and C.HEIDELBERGER: Incorporation of uracil-2-C^{14} into some normal resting, normal growing and neoplastic tissues in the rat. Fed. Proc. 14, 243 (1955).

MALEY,F. and G.F.MALEY: Nucleotide Interconversions.IV. Activities of deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthetase in normal rat liver and hepatomas. Cancer Res. 21, 1421 (1961).

- - : Nucleotide Interconversions. VIII. Thymidine sparing effect on the utilisation of de-cytidine by chick-embryo mince. Biochim. Biophys. Acta 68, 293-3o1 (1963).

MARSH,J.C. and S.PERRY: Thymidine cytobolism by normal and leucemic human leucocytes. J. Clin. Invest. 43, 267-278 (1964 a).

- - : The reduction of thymine by human-leucocytes. Arch. Biochem. Biophys. 1o4, 146-149 (1964 b).

MÜLLER,D.: Autoradiographische Untersuchungen zur Bildung eines Pools von ^{3}H-Thymidin-Derivaten bei HeLa-Zellen. Naturwissenschaften 53, 5o3-5o4 (1966 a).

- - : Autoradiographische Untersuchungen an HeLa-Zellen über die Brauchbarkeit des ^{3}H-Desoxycytidins als spezifischer Vorläufer der Desoxyribonukleinsäure. Exptl. Cell Res. 44, 627-631 (1966 b).

MÜLLER,D. and R.RATHENBERG: Determination of deoxycytidine metabolism in HeLa cell cultures. J. Biol. Chem. (1967), in Vorbereitung.

PAINTER,R.B. and R.M.DREW: Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell cultures (HeLa). Lab. Invest. 8, 278-285 (1959).

PILGRIM,CH. und W.MAURER: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin. Naturwissenschaften 49, 544-545 (1962).

QUASTLER,H. and F.G.SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exptl. Cell Res. 17, 42o-438 (1959).

RACHMELER,M., J.GERHARDT and J.ROSNER: Limited thymidine uptake in Escherichia coli due to an inducible thymidine phosphorylase. Biochim. Biophys. Acta 49, 222-225 (1961).

REICHARD,P. and B.ESTBORN: Utilization of deoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. J. Biol. Chem. 188, 839-846 (1951).

RUBINI,J.R., S.KELLER, A.EISENTRAUT and E.P.CRONKITE: In-vitro metabolism of ^{3}H-thymidine. In: Tritium in Physical and Biol. Sc., II. Int. At. En. Agency, Vienna (1962), 247-267.

SANDER,K.U.: Pyrimidinnuklêoside als Vorläufer der Nukleinsäuren von Candida albicans. Inauguraldissertation Marburg/Lahn (1968).

SCHNEIDER,W.C. and J.ROTHERHAM: Some studies on the metabolism of deoxycytidine-2-C^{14} by hepatoma cells. J. Biol. Chem. 236, 2764-2767 (1961).

STEWART,P.A., H.QUASTLER, M.R.SKOUGAARD, D.R.WIMBER, M.F.WOLFSBERG, C.A.PEROTTA, B.FERBEL and M.CARLOUGH: Four-factor model analysis of thymidine incorporation into mouse DNA and the mechanism of radiation effects. Radiation Res. 24, 521-537 (1965).

TAYLOR,H.: Autoradiography with tritium-labelled substances. Advances in Biol. and Med. Physicy 7, 1o7-13o (196o a).

- - : Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 455-463 (196o b).

ZAJICEK,G., N.BERNSTEIN, A.ROSIN and J.GROSS: Studies on the in-vitro incorporation of tritiated thymidine into ascites tumor cells. Exptl. Cell Res. 31, 39o-396 (1963).

Herrn Prof. Dr. med. R. Siegert möchte ich für die Arbeitsmöglichkeiten im Isotopenlabor des Hygiene-Institutes und sein stetiges Interesse an den Untersuchungen meinen besonderen Dank sagen.

Herrn Doz. Dr. med. D. Müller danke ich für die Überlassung des Themas und die unermüdliche und sachkundige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

In Kiel: Büttner, Doerr, Drubbe, Gärtner, Hörmann, Reinwein, Smolka, Staemmler, Walther und Wanke.

In Marburg: Beckmann, Berendes, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Exner, Gedigh, Golenhofen, Graul, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Hundeshagen, Jacob, Kessler, Lang, Linneweh, Lübbers, Mahr, du Mesnil de Rochement, Neubauer, Niessing, Oehmig, Oksche, Petry, Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Wendt und Würterle.

Lebenslauf.

Am 2o. Januar 194o wurde ich als Sohn des Realschullehrers Paul Rocker und seiner Ehefrau Adeline, geb. Gißke, in Duisburg geboren. Von 1946 bis 195o besuchte ich die Volkschule in Duisburg-Hamborn und anschließend das Max-Planck-Gymnasium in Duisburg-Meiderich bis zu meinem Abitur im Frühjahr 1959.

Zum Sommer-Semester 1959 wurde ich in Marburg immatrikuliert, wo ich auch mein Physikum ablegte. Das klinische Studium begann ich im Sommer-Semester 1962 und beendete nach fünf weiteren klinischen Semestern in Marburg im August 1965 mein Medizinisches Staatsexamen.

Die Ausbildung als Medizinalassistent begann ich im Isotopenlabor des Hygiene-Institutes der Universität Marburg. Nach der Tätigkeit auf der Geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung der Klinik St. Elisabeth in Marburg setzte ich die Ausbildung am Kreiskrankenhaus Osterholz-Scharmbeck bei Bremen fort. Nach vier Monaten auf der Chirurgischen Abteilung und neun Monaten auf der Internen Abteilung erhielt ich Ende November 1967 meine Approbation.

Ich bin verheiratet und habe zwei Kinder.